



Analisis Keanekaragaman Genetika dan Diferensiasi Jati Jawa dan Madura Berdasarkan Marka Mikrosatelit Untuk Mendukung Fingerprinting Jati

Analysis of Genetic Diversity and Differentiation of Java and Madura Teak Based on Microsatellite markers to Support Teak Fingerprinting

✉ Mun Isyatul Millah, Noor Aini Habibah, Endah Suwarni, Amin Rertoningsih

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima Juli 2012
Disetujui Agustus 2012
Dipublikasikan September 2012

Keywords:

*fingerprinting DNA;
teak differentiation; teak
microsatellite*

Abstrak

*Fingerprinting jati diperlukan untuk melengkapi data base konservasi plasma nutfah jati. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi keanekaragaman genetika pohon jati berdasarkan marka mikrosatelit dan mengidentifikasi alel spesifik pada lokus tertentu yang dapat menjadi penciri khas jati populasi Jawa dan Madura. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi karakteristik jati plus (*fingerprinting*) secara molekuler menggunakan penanda mikrosatelit. Sampel diambil dari koleksi jati plus di Kebun Benih Klonal (KBK) di Jawa dan dari lokal Areal Produksi Benih (APB) Madura. Sampel diisolasi menggunakan metode CTAB. Amplifikasi DNA menggunakan 3 primer mikrosatelit dan hasilnya divisualisasi pada gel poliakrilamid dengan pewarnaan *silver*. Hubungan kekerabatan dianalisis melalui program NTSYSpc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Sistem*) versi 2.01. Hasil analisis menunjukkan tingkat keanekaragaman jati yang tinggi, didukung oleh nilai *Observed Heterozygosity* (H_o), *Expected Heterozygosity* (H_e), *Polymorphism Information Content* (PIC) dan koefisien diferensiasi genetika berturut-turut 0.5122; 0.6221; 0.5818; dan 0.0629. Hubungan kekerabatan melalui analisis dendrogram menghasilkan koefisien kemiripan 0.3-1.00. Nilai keanekaragaman dalam populasi (H_s), antar populasi (D_{ST}), dan nilai diferensiasi (G) berturut-turut adalah 0.5817, 0.0391, dan 0.0629. Dari hasil analisis disimpulkan bahwa tingkat keanekaragaman jati di Jawa dan Madura termasuk tinggi dan ada indikasi perbedaan genetika di dalam populasi lebih tinggi dibanding antar populasi.*

Abstract

*Fingerprinting teak is required to complete the data base teak germplasm conservation. This research aimed to obtain information about the genetic diversity of teak based on microsatellite markers and identify specific allele at a particular locus can be distinctive identity identifier population of Java and Madura. In this research is to identify the characteristics of teak plus (*fingerprinting*) molecularly using microsatellite markers. Samples were taken from the collection of teak plus in Kebun Benih Klonal in Java and from Areal Produksi Benih Madura. Samples were isolated using the CTAB method. Amplification of DNA using microsatellite primer 3 and the results are visualized on a polyacrylamide gel by silver staining. Kinship analyzed through NTSYSpc program (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) version 2.01. The analysis showed a high level of diversity teak, supported by Heterozygosity Observed value (H_o), Expected Heterozygosity (H_e), polymorphisms Information Content (PIC) and genetic differentiation coefficient 0.5122 respectively; 0.6221; 0.5818; and 0.0629. Kinship through analysis dendrogram generate similarity coefficient 0.3-1.00. The value of diversity in the population (H_s), between populations (D_{ST}), and the value of differentiation (G) respectively are 0.5817, 0.0391, and 0.0629. From the analysis concluded that the level of diversity of teak in Java and Madura are high, and there are indications of genetic differences in the population is higher than among the population.*

© 2012 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:

FMIPA UNNES Gd D6 Lt 1 Jln. Raya Sekaran- Gunungpati- Semarang 50229
Telp./Fax. (024) 8508033; E-mail: isy_meella@yahoo.com

ISSN 2085-191X

PENDAHULUAN

Jati merupakan salah satu jenis tumbuhan kayu di Indonesia yang mempunyai nilai ekonomis tinggi. Kebutuhan masyarakat terhadap kayu jati semakin meningkat dari tahun ke tahun karena kayunya memiliki struktur yang indah (Chasani, 2007), kekuatan yang cukup tinggi, awet, sedikit menyusut, sedikit bercabang, berbatang lurus dan silindris (Febrianto *et al.*, 2000)

Jati di Indonesia berasal dari India (Siregar, 2005), namun penelitian menggunakan teknik isoenzim menunjukkan bahwa jati merupakan jenis asli Indonesia. Hutan jati khususnya di Jawa dan Madura mempunyai area yang sangat luas. Tanaman jati mempunyai potensi yang lebih besar untuk dikembangkan, karena diketahui tanaman jati yang ditanam di Jawa mencapai 62,88% dari total populasi tanaman jati di Indonesia (BPS & DepHut, 2004), hal itu disebabkan kesesuaian lahan di Jawa untuk pertumbuhan tanaman jati. Selain di Jawa, potensi sumber daya hutan jati yang cukup besar juga terdapat di Madura.

Jumlah polinator yang beragam pada area hutan jati memungkinkan terjadi penyerbukan silang antara varietas dan generasi yang berbeda (Pane, 1980). Keadaan tersebut menyebabkan heterosigositas muncul pada keturunan jati yang akan memperbesar variasi fenotipe maupun genotipe, sehingga muncul berbagai varietas jati seperti Jati Lengo, Jati Sungu dan Jati Werut. Perbedaan varietas jati selain karena faktor genetika, kondisi lingkungan seperti iklim yang berbeda juga sangat mempengaruhi tingkat keanekaragaman genetika jati. Penyebab keanekaragaman atau varietas diketahui ada tiga faktor yaitu perbedaan lingkungan tempat tumbuh, perbedaan genetika dan interaksi antara keduanya.

Profil *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) yang berbeda pada individu yang berbeda disebut DNA *fingerprinting* yang dapat digunakan untuk mendeteksi keanekaragaman genetika pada suatu spesies tanaman. Informasi tentang karakterisasi DNA jati diperlukan untuk mempelajari keanekaragaman genetika, hubungan filogenetika dan DNA *fingerprinting*. Analisis *fingerprinting* diperlukan untuk melengkapi *data base* koleksi plasma nutfah Jati dan sebagai perlindungan varietas tanaman serta mempermudah pelaksanaan Lacak Balak Kayu Jati.

Karakterisasi DNA jati dapat dilakukan menggunakan penanda molekuler, yaitu penanda yang mengandalkan sifat-sifat aplikatif DNA atau cDNA yang terlihat oleh mata atau terdeteksi dengan bahan dan alat tertentu (Smagn *et al.*, 2002). Marka tersebut di antaranya adalah

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), dan mikrosatelit (Prasetyono *et al.*, 2008).

Salah satu upaya identifikasi plasma nutfah jati dapat dilakukan melalui analisis marka mikrosatelit. Mikrosatelit merupakan marka berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang memerlukan primer. Sebagai marka genetika, mikrosatelit sangat berlimpah dalam genom, tingkat polimorfismenya lebih tinggi dari marka genetika lain (Holton, 2001), bersifat kodominan sehingga dapat digunakan untuk menentukan nilai heterosigositas, tidak dipengaruhi oleh lingkungan, aplikasi mikrosatelit tidak memerlukan waktu lama dan mempunyai kemampuan yang tinggi untuk menunjukkan diversitas di antara kultivar. Kelebihan-kelebihan mikrosatelit dapat digunakan untuk memperoleh banyak informasi tentang perbedaan genetika pada varietas jati di Indonesia khususnya pada populasi Jawa dan Madura. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi keanekaragaman genetika pohon jati berdasarkan marka mikrosatelit dan mengidentifikasi alel spesifik pada lokus tertentu yang dapat menjadi penciri khas jati populasi Jawa dan Madura.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika Molekuler, Perum Perhutani Cepu dan Laboratorium Genetika dan Molekuler, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang. Sampel yang digunakan adalah 39 klon jati (7 sampel dari daerah Clangap atau Randublatung dan 32 sampel dari Ngawi) koleksi KBK populasi Jawa dan 9 sampel jati dari APB jati Madura. Jenis organ yang digunakan adalah daun jati yang muda dan daun jati yang tua.

Rancangan penelitian ini yaitu 46 sampel DNA jati diamplifikasi menggunakan 3 jenis primer (Tabel 1) sehingga terdapat 138 sampel jati Jawa dan Madura yang akan dianalisis.

Penelitian ini dimulai dengan mengambil sampel berupa daun dengan gunting yang tajam dan steril. DNA jati diisolasi dari daun menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi (Doyle & Doyle, 1987). Batas kemurnian DNA yang biasa dipakai dalam analisis molekuler mempunyai rasio A260/A280 sekitar 1,8 sampai 2,0.

Elektroforesis Horizontal dengan Gel Agrose dimulai dengan pembuatan gel agrose 1 %. Lalu elektroforesis dilakukan menggunakan buffer TBE 0,5X. *loading dye* sebanyak 2,5 µl diletak-

Tabel 1. Primer mikrosatelit jati

No	Primer	Sekuen Primer	Jumlah Basa
1	Tg-AC28	<i>forward: 5'-ACGGCTATCAGACCAGCAGA-3'</i> <i>reserver: 5'-ATGCATGGCATGTTCTACCC-3'</i>	20
2	Tg-ATC02	<i>forward: 5'-TCAAAGCTTGGCTACCACCA-3'</i> <i>reserver: 5'-GCCGAATTGGGACGACTTTA-3'</i>	20
3	TgAAG10	<i>forward: 5'-GTGCACCAAGTCCGAGCAAT-3'</i> <i>reserver: 5'-CGAGAACCCGAACCTAACCA-3'</i>	20

kan di atas parafilm, ditambahkan 2,5 µl sampel DNA jati, kemudian kedua larutan dicampur menggunakan pipet dan dimasukkan ke dalam sumur gel dengan hati-hati. Elektroforesis dijalankan pada 100 volt selama 30 menit. Setelah elektroforesis selesai, gel dimasukkan ke dalam UV *transluminator*.

Campuran (*master mix*) sebanyak 12,5 µl yang terdiri atas 10 ng DNA *template*, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0,2-1 µM untuk setiap primer, enzim *Taq polimerase* dan buffer 1X, kemudian campuran dimasukkan ke dalam tabung PCR 0,2 ml. Tabung yang berisi campuran larutan 12,5 µl dimasukkan ke dalam *Thermal Cycler Chain Reaction* dengan kondisi suhu denaturasi awal 94°C selama 4 menit, denaturasi akhir pada 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik (suhu bergantung primer), *elongasi* pada 72 °C selama 1 menit dan ekstensi pada 72°C selama 5 menit. Proses PCR berlangsung selama 35 siklus. Keberhasilan PCR diuji melalui elektroforesis dengan gel agarose 0,8%.

Elektroforesis model vertikal terdiri atas dua plat kaca yang steril. Kemudian dilapisi dengan Sigmacote 350 µl. Lalu membuat larutan stok urea akrilamid 6%. Larutan poliakrilamid dituangkan di antara rongga kedua plat kaca dengan cepat dan hati-hati agar tidak terbentuk gelembung. Kemudian dilakukan pewarnaan perak dengan mengikuti metode yang telah digunakan Retnoningsih (2009).

Setiap pita yang muncul pada gel merupakan alel tertentu pada satu lokus yang sama dari beberapa sampel jati yang dibandingkan. Setiap alel dianggap mewakili satu karakter dan diberi nilai berdasarkan ada tidaknya suatu alel. Nilai 1 diberikan apabila ada alel dan nilai 0 diberikan apabila tidak ada alel. Estimasi keanekaragaman genetika dianalisis melalui jumlah dan frekuensi alel yang terungkap, Heterosigositas aktual atau *Observed Heterozigosit* (Ho), heterosigositas harapan atau *Expected Heterozygosity* (He) dan polimorfisme pada tingkat individu maupun populasi atau *Polimorfisme Information Content* (PIC). Frekuensi alel dianalisis menggunakan rumus Nei

(1987):

$$p_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n}$$

Ket: p_i = frekuensi alel ke-i

n = jumlah individu untuk genotipe A_iA_i

n_{ii} = jumlah individu untuk genotipe A_iA_j

n = jumlah sampel

Heterosigositas yang muncul di lapangan yang disebut juga heterosigositas aktual atau *Observed Heterozigosit* (Ho) dapat dianalisis menggunakan rumus Lowe *et al.* (2004):

$$H_o = \frac{\text{Jumlah heterosigositas pada lokus}}{\text{Jumlah individu yang dianalisis}}$$

Heterosigositas perkiraan yang disebut juga heterosigositas harapan atau *Expected Heterozygosity* (He) dapat dianalisis menggunakan rumus Nei (1987):

$$H_e = \frac{2n}{2n - 1} (1 - \sum p_i^2)$$

Keterangan: p_i = frekuensi alel ke i

n = jumlah sampel

Nilai polimorfisme pada individu atau PIC digunakan untuk mengukur diversitas alel pada suatu lokus sehingga diketahui ada tingkat polimorfisme pada lokus tertentu, dapat dianalisis menggunakan rumus Anderson *et al.* (1993):

$$PIC = 1 - \sum p_i^2$$

Nilai diferensiasi genetika dapat digunakan untuk mempelajari keanekaragaman genetika baik dalam subpopulasi maupun antara populasi, meliputi nilai keanekaragaman genetika di dalam dan antar populasi, serta total keanekaragaman genetika. Nilai diferensiasi genetika dapat ditentukan menggunakan rumus Nei (1987) dan Lowe *et al.* (2004):

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

$$H_T = 1 - \sum p^2$$

$$D_{ST} = H_T - H_S$$

$$H_S = \frac{\sum (1 - \sum p_i^2)}{s}$$

Keterangan:

H_s = keanekaragaman genetica dalam populasi

D = keanekaragaman genetica antar populasi

H_{ST} = total keanekaragaman genetica

G_T = koefisien diferensiasi genetica

s = jumlah populasi

p = rata-rata frekuensi alel

p_i = frekuensi alel ke i

Setelah komposisi alel diketahui, genotipe setiap klon jati yang homozigot dan heterozigot dapat ditentukan. Hubungan kekerabatan dianalisis melalui analisis similaritas menggunakan program NTSYSpc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Sistem*) versi 2.01d.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis amplifikasi mikrosatelit menunjukkan beberapa pita DNA yang disebut juga alel yaitu ukuran sekuen DNA yang berbeda pada lokus yang sama (Nei & Kumar, 2000). Perbedaan ukuran alel tersebut karena perbedaan jumlah repeat basa (Bennet, 2000). Untuk memudahkan analisis selanjutnya pita yang muncul diberi skor 1 dan yang tidak muncul diberi skor 0.

Visualisasi pada *Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (PAGE) untuk primer TgAC28, Tg-ATC02 dan Tg-AAG10 pada 46 sampel DNA jati Jawa dan Madura menghasilkan total jenis alel 18 dengan rata-rata 6 alel per lokus (Tabel 2). Ketiga lokus dapat mendeteksi alel pada setiap klon dengan jumlah yang bervariasi. Klon yang mempunyai satu alel disebut homozigot, sedangkan dua alel atau lebih disebut heterozigot.

Tabel 2. Jumlah alel berdasarkan 3 lokus mikrosatelit pada KBK Jawa dan APB Madura

No	Lokus	Suhu Annealing (°C)	Jumlah Alel
1	Tg-AC28	57	4
2	Tg-AT02	55	6
3	TgAAG10	55	8
Total			18
Rata-rata			6 per lokus

Analisis mikrosatelit menggunakan primer Tg-AC28 pada 46 klon jati Jawa dan Madura terdeteksi 4 macam alel yaitu alel A, B, C dan D. Jumlah total alel yang terdeteksi sebanyak 57 alel. Sampel pada populasi Jawa terdiri atas dua KBK yaitu KBK Clangap dan KBK Ngawi. Lokus Tg-AC28 mendeteksi jati yang mempunyai jumlah alel 1 dan 2 masing-masing sebanyak 30 dan 16 klon. Kelompok jati yang mempunyai 1 alel terdiri atas klon dari KBK Clangap, KBK

Ngawi dan APB Madura masing-masing sebanyak 7, 22, dan 1 klon. Kelompok jati yang mempunyai 2 alel terdiri atas klon dari KBK Ngawi dan APB Madura masing-masing sebanyak 10 dan 6 klon. Lokus Tg-AC28 mendeteksi 1 macam alel pada klon dari KBK Clangap yaitu alel B sedangkan pada klon dari KBK Ngawi dan APB Madura mendeteksi semua alel kecuali alel C pada klon dari APB Madura. Lokus Tg-AC28 berhasil diamplifikasi pada suhu *annealing* 57 °C. Variasi alel pada lokus Tg-AC28 dapat dibedakan dengan jelas dan estimasi panjang alel telah diketahui yaitu 200 bp (Palupi, 2005) dan merupakan jumlah alel paling sedikit di antara ketiga lokus. Primer ATC02 mendeteksi 6 jenis alel dalam analisis mikrosatelit yang tampak pada PAGE yaitu alel A, B, C, D, E dan F. Jumlah total alel yang terdeteksi sebanyak 77 alel. Lokus ATC02 mendeteksi sampel jati yang mempunyai jumlah alel 1, 2 dan 3 masing-masing sebanyak 17, 27 dan 2 klon. Kelompok jati yang mempunyai 1 alel terdiri atas klon dari KBK Clangap, KBK Ngawi dan APB Madura masing-masing sebanyak 3, 12, dan 2 klon, sedangkan kelompok jati yang mempunyai 2 alel masing-masing berjumlah 4, 20 dan 5 klon. Lokus ATC02 mendeteksi kelompok jati yang mempunyai 3 alel, terdiri atas 2 klon yaitu klon dari KBK Ngawi. Lokus ATC02 mendeteksi semua jenis alel pada KBK populasi Jawa kecuali alel C pada sampel dari KBK Clangap, sedangkan pada populasi APB Madura mendeteksi 4 jenis alel antara lain alel B, C, E, dan F. Lokus ATC02 berhasil diamplifikasi pada suhu *annealing* 55 °C. Variasi alel pada lokus ATC02 dapat dibedakan dengan jelas dan estimasi panjang alel telah diketahui yaitu 208 bp (Palupi, 2005).

Hasil analisis lokus Tg-AAG10 pada gel poliakrilamid menunjukkan tingkat variasi alel yang paling tinggi di antara 3 lokus mikrosatelit. Alel yang terdeteksi sebanyak 8 macam antara lain alel A, B, C, D, E, F, G, dan H. Jumlah total alel yang terdeteksi sebanyak 71 alel. Lokus Tg-AAG10 mendeteksi sampel jati yang mempunyai alel 1 dan 2 masing-masing berjumlah 21 dan 25 klon. Kelompok jati yang mempunyai 1 alel terdiri atas klon dari KBK Clangap, KBK Ngawi dan APB Madura masing-masing sebanyak 5, 15, dan 1 klon, sedangkan kelompok jati yang mempunyai 2 alel masing-masing sebanyak 2, 17, dan 6 klon. Lokus Tg-AAG10 berhasil diamplifikasi pada suhu *annealing* 55 °C. Variasi alel pada lokus Tg-AAG10 dapat dibedakan dengan jelas dan estimasi panjang alel telah diketahui yaitu 243 bp (Palupi, 2005). Semua jenis alel terdeteksi oleh Lokus Tg-AAG10 pada klon dari KBK Ngawi. Lokus Tg-AAG10 mendeteksi 5 dan 6 alel pada

klon KBK Clangap dan APB Madura, sedangkan alel yang tidak terdeteksi pada kedua klon adalah alel C. Alel yang tidak terdeteksi pada KBK Clangap, KBK Ngawi dan APB Madura masing-masing yaitu F, H dan E.

Hasil amplifikasi mikrosatelit pada PAGE bervariasi antara lain muncul pitapita meragukan (tidak jelas), pita semu dan tidak muncul pita (Gambar 1), sehingga pembacaan visualisasi pita pada PAGE diperlukan ketelitian. Pita yang meragukan dapat berasal dari kontaminasi pita di samping kanan dan kiri. Pita-pita semu muncul kemungkinan karena mutasi akibat kesalahan replikasi pada saat amplifikasi (PCR) (Lai *et al.*, 2003), sehingga muncul dua pita yang sebenarnya satu pita. Dalam hal ini mutasi terjadi karena penambahan atau pengurangan basa pada saat proses amplifikasi (*Slippage mutation*) (Lai *et al.*, 2003). Pada pertengahan siklus PCR, *slippage mutation* akan diteruskan pada siklus amplifikasi selanjutnya, sehingga terdeteksi dua atau lebih macam pita yang mempunyai jarak dekat. Pita yang tidak jelas dapat terjadi karena kontaminasi terutama urea pada permukaan sumur gel poliakrilamid. Urea yang menghambat migrasi DNA, sehingga perlu dicek kembali pada PAGE pita-pita yang tidak jelas dan meragukan. Sedangkan pita yang tidak muncul dapat disebabkan oleh kegagalan amplifikasi mikrosatelit.

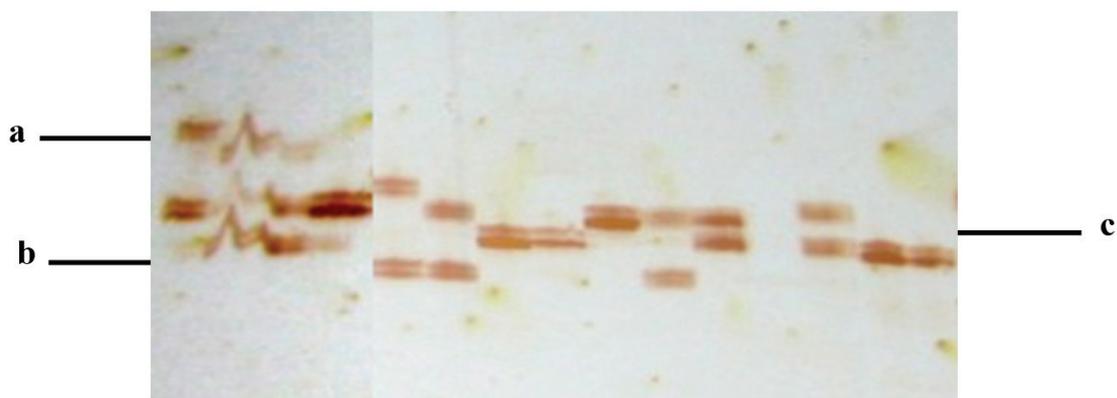
Keberhasilan amplifikasi mikrosatelit pada jati dipengaruhi oleh kualitas DNA genom, primer, konsentrasi larutan dan kondisi suhu pada siklus PCR terutama pada suhu *annealing*. DNA genom jati untuk mikrosatelit sebenarnya tidak membutuhkan kualitas yang terlalu bagus apabila kontaminan polisakarida bersifat netral (arabinogalaktan, dekstran, gum guar, gum *locust bean*, inulin, manan, dan pati) karena mikrosatelit hanya mengamplifikasi pada daerah target (Prana & Hartati, 2003). Hal itu berbeda apabila DNA genom mengandung kontaminan polisakarida yang

bersifat asam (karagenan, dekstran sulfat, gum *ghatti*, pektin, dan silan), karena menyebabkan DNA tidak teramplifikasi (Pandey *et al.*, 1996). Struktur polisakarida yang mirip dengan asam nukleat (DNA) menyebabkan polisakarida dapat mengendap bersama asam nukleat dan menghambat kerja enzim dan *Taq polimerase* (Porebski *et al.*, 1997). Selain itu DNA yang terlalu pekat juga dapat menyebabkan primer tidak menempel pada daerah target (Qiagen, 2001).

Suhu *annealing* terlalu tinggi menyebabkan penempelan primer lemah dan produk DNA yang dihasilkan sedikit, sehingga hasil visualisasi DNA tipis. Suhu *annealing* yang terlalu rendah menyebabkan penempelan primer tidak spesifik dan menempel di sembarang tempat sehingga daerah target tidak teramplifikasi namun banyak dihasilkan produk non spesifik dan visualisasi DNA tebal atau smear (Kantety *et al.*, 1995). Suatu alel maupun genotipe spesifik yang ditemukan dapat berpotensi sebagai penciri apabila berkaitan dengan gen-gen penting yang bermanfaat, kemungkinan juga merupakan bagian plasma nutfah yang belum dimanfaatkan atau belum ditemukan dan diketahui manfaatnya (Santoso *et al.*, 2006).

Pemilihan primer sangat diperlukan untuk mendukung keberhasilan proses amplifikasi dan dapat menghasilkan produk amplifikasi yang diinginkan. Dasar pemilihan primer yang baik dapat ditentukan dari (1) panjang primer, (2) komposisi basa, (3) Penentuan temperatur *annealing*, 4) Pemilihan basa pada ujung 3', (5) Menghindari penempelan sesama primer.

Panjang primer yang digunakan pada umumnya sekitar 20-30 nukleotida. Komposisi basa primer terdiri atas 40-60% GC dan paling baik adalah 50% GC, karena kandungan GC pada masing-masing primer mempengaruhi kerja denaturasi dan *annealing* pada proses amplifikasi. Basa GC akan membentuk ikatan hidrogen rang-



Gambar 1. Profil pita yang muncul pada gel poliakrilamid. Keterangan: a. pita yang tidak jelas; b. pita semu; dan c. tidak muncul pita

Tabel 3. Frekuensi Alel lokus Tg-AC28, Tg-ATC02 dan Tg-AAG10

No	Alel	Lokus					
		TGAC28		ATC02		AAG10	
		Jawa	Madura	Jawa	Madura	Jawa	Madura
1	A	0.0385	0.2143	0.0256	-	0.0769	0.0714
2	B	0.7692	0.6428	0.0641	0.1428	0.1026	0.0714
3	C	0.0256	-	0.0385	0.0714	0.0769	-
4	D	0.1667	0.1428	0.141	-	0.1923	0.4286
5	E	-	-	0.5769	0.6428	0.3718	-
6	F	-	-	0.1795	0.1428	0.0256	0.0714
7	G	-	-	-	-	0.1026	0.2143
8	H	-	-	-	-	0.0513	0.1428

kap tiga dengan basa komplementernya, sehingga dapat mengikat kuat pada urutan DNA target sepanjang genom.

Berdasarkan hasil amplifikasi, ketiga lokus terdeteksi pada semua klon jati (48 sampel) kecuali lokus Tg-AAG10 yang tidak terdeteksi pada klon J40 dan J85 dari Madura, sehingga yang digunakan dalam analisis selanjutnya sebanyak 46 klon karena pada klon J40 dan J85 tidak mewakili ketiga lokus yang digunakan. DNA target tidak teramplifikasi karena beberapa faktor yaitu molekul DNA *double strand*

yang tidak dapat terdenaturasi menjadi *single strand*, primer tidak dapat menempel pada DNA target dan DNA *polimerase* gagal memperpanjang daerah yang ditempel primer untuk menyempurnakan daerah target (Lai *et al.*, 2003). Kemungkinan yang lain adalah urutan basa nukleotida dari primer tersebut bukan merupakan komplemen dari basa nukleotida pada cetakan DNA target. Hal ini menyebabkan primer-primer tersebut tidak dapat mengamplifikasi fragmen DNA (Hartati *et al.*, 2007).

Keanekaragaman genetika merupakan variasi sifat di dalam jenis yang mempengaruhi individu untuk beradaptasi pada berbagai kondisi lingkungan. Keanekaragaman genetika dapat ditunjukkan melalui jumlah dan frekuensi alel, genotipe serta nilai heterosigositas. Jumlah alel yang dapat dideteksi berdasarkan analisis mikrosatelit bergantung jumlah individu yang dianalisis (Cerenak *et al.*, 2004). Koleksi jati di Kebun Benih Klonal (KBK) merupakan koleksi pohon-pohon plus jati dari berbagai daerah sehingga jenis individu jati lebih bervariasi. Oleh karena itu semakin besar jumlah individu yang dianalisis maka kemungkinan semakin besar pula jenis alel yang ditemukan (Jetse *et al.*, 2002). Selain jumlah individu, jumlah lokus juga mempengaruhi alel yang terdeteksi. Analisis 46 sampel jati populasi Jawa

dan Madura menggunakan 3 lokus mikrosatelit dalam penelitian ini menghasilkan 18 macam alel dengan rata-rata 6 alel per lokus, sedangkan analisis 120 tanaman jati populasi Sulawesi Tenggara menggunakan 10 lokus mengungkap 43 alel dengan rata-rata 4.3 alel per lokus (Boer, 2007).

Struktur genetika populasi jati Jawa dan Madura dapat ditentukan dari susunan frekuensi alel dan genotipe. Berdasarkan jumlah alel, lokus Tg-AAG10 lebih bervariasi dibandingkan lokus Tg-AC28 dan Tg-ATC02. Frekuensi jenis alel tertinggi pada lokus Tg-AC28, Tg-ATC02, dan Tg-AAG10 adalah alel B (76.9%), E (57.69%), dan D (43.8%), sedangkan terendah adalah alel C, A, dan F masing-masing sebesar 2.5% (Tabel 3).

Variasi alel yang tinggi dalam KBK karena merupakan kumpulan koleksi pohon-pohon jati plus dari berbagai daerah. Variasi alel yang ditemukan dapat terjadi secara spontan atau karena induksi. Mutasi juga merupakan sumber variasi alel yaitu sebagai dasar pembentukan variasi genotipe. Mutasi spontan terjadi dengan sendirinya, belum diketahui penyebabnya sehingga menghasilkan beberapa perubahan pada urutan DNA dan produk gen, sedangkan mutasi induksi disebabkan interaksi DNA genom dengan mutagen. Variasi alel yang tinggi dalam KBK karena merupakan kumpulan koleksi pohon-pohon jati plus dari berbagai daerah. Variasi alel yang ditemukan dapat terjadi secara spontan atau karena induksi. Mutasi juga merupakan sumber variasi alel yaitu sebagai dasar pembentukan variasi genotipe. Mutasi spontan terjadi dengan sendirinya, belum diketahui penyebabnya sehingga menghasilkan beberapa perubahan pada urutan DNA dan produk gen, sedangkan mutasi induksi disebabkan interaksi DNA genom dengan mutagen.

Ho merupakan proporsi genotipe heterozigot dari hasil analisis (aktual) untuk setiap

lokus pada semua populasi. Heterosigositas disebut juga keanekaragaman gen (Nei, 1987) yang diperlukan untuk menghindari genotipe-genotipe penting menjadi punah. He merupakan perkiraan atau prediksi dasar proporsi individu heterozigot yang diketahui dari frekuensi alel pada setiap lokus, sehingga dapat dibandingkan antara perkiraan nilai heterosigositas berdasarkan prinsip Hardy-Weinberg dengan nilai heterosigositas di lapangan. Nilai polimorfisme pada individu atau PIC digunakan untuk mengukur diversitas alel pada suatu lokus sehingga diketahui ada tingkat polimorfisme pada lokus tertentu.

Nilai H_o dan PIC tertinggi terdapat pada lokus Tg-AAG10 (0.8571 dan 0.7886) dan terendah pada lokus Tg-AC28 (0.1428 dan 0.3784). Nilai PIC pada lokus Tg-AC28 rendah karena persentase genotipe homosigot lebih banyak dari genotipe heterosigot, namun hasil perhitungan PIC (0.3784) menunjukkan bahwa lokus ini masih bersifat polimorfik dan dapat digunakan untuk analisis. Suatu lokus dikatakan polimorfik jika nilai polimorfisme lokus ≥ 0.95 dan monomorfik jika nilainya > 0.95 (Nei, 1987; Maideliza & Mansyurdin, 2007). Nilai rata-rata PIC yang cukup tinggi (0.5818) menunjukkan bahwa jati merupakan tanaman yang lebih banyak berkembangbiak melalui reproduksi seksual dengan cara penyerbukan silang (Boer, 2007).

Beberapa klon mempunyai koefisien kemiripan 100% yaitu klon J93 dari KBK Clangap, J20, J101 dan J24 dari KBK Ngawi, klon J62 dan J77, klon J29 dan J44, keempat klon berasal dari KBK Ngawi, serta klon J26 dari KBK Clangap sama dengan J65 dari KBK Ngawi. Kemiripan 100% kemungkinan karena klon-klon tersebut berasal dari *mother tree* yang sama, selain itu pada penelitian ini terbatas hanya menggunakan 3 lokus, padahal lokus mikrosatelit berjumlah banyak dan tersebar di dalam genom tanaman. Analisis menggunakan lebih banyak lokus akan memberikan hasil yang berbeda. Analisis pada banyak lokus perlu dilakukan untuk memastikan kemiripan tersebut dan untuk mendapatkan pengelompokan provenan yang akurat. Dendrogram jarak genetika dapat berubah tergantung substitusi nukleotida dan jumlah sampel yang berpengaruh terhadap polimorfisme alel pada suatu populasi.

Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata keanekaragaman genetika antara populasi (D_{ST}) dan dalam populasi (H_S) masing-masing 0.0391 dan 0.5817, sedangkan nilai keanekaragaman genetika total antara populasi (H_T) 0.6208, sehingga diperoleh koefisien diferensiasi genetika (G_{ST}) sebesar 0.0629. Koefisien G_{ST} menunjukkan nilai yang sedikit, hal itu sesuai untuk menggam-

barkan tingkat keanekaragaman populasi total yang tinggi karena semakin tinggi keanekaragaman populasi total maka nilai koefisien diferensiasi genetika (G_{ST}) semakin rendah (Nei, 1987). Nilai diferensiasi genetika dapat digunakan untuk mempelajari keanekaragaman genetika baik dalam subpopulasi maupun antara populasi.

Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai H_S (0.5817) jauh lebih besar dari nilai D_{ST} (0.0391), hal itu mengindikasikan perbedaan genetika di dalam populasi lebih tinggi dibanding antar populasi. Penelitian lain pada jati Jawa dan Sulawesi juga menunjukkan keanekaragaman genetika dalam populasi lebih tinggi dari pada keanekaragaman antara populasi dengan perbedaan genetika (G_{ST}) sebesar 0.1051 (Chasani, 2007).

Hasil analisis penelitian ini tidak terdeteksi alel spesifik, namun dideteksi 12 genotipe spesifik karena hanya ditemukan satu di antara susunan genotipe yang terdeteksi pada satu lokus yang sama. Pada sampel jati dari KBK Clangap pada lokus Tg-AC28 hanya ditemukan 1 macam alel yaitu alel B. Alel ini merupakan alel yang selalu ditemukan pada setiap sampel dari populasi Ngawi dan Madura. Analisis lebih lanjut dengan menambah klon dari KBK Clangap sangat diperlukan untuk mengetahui sifat spesifik dari alel B yang dideteksi oleh lokus Tg-AC28.

Pada lokus TG-AC28 tidak terdeteksi alel atau genotipe spesifik. Pada lokus Tg-ATC02 mendeteksi 3 genotipe spesifik yaitu BD, BF, dan CF. Genotipe BD spesifik pada populasi Jawa daerah Clangap, sedangkan sisanya spesifik pada daerah Ngawi. Pada lokus Tg-AAG10 terdapat 9 genotipe spesifik dari 19 genotipe yang terdeteksi, 3 genotipe spesifik pada populasi Madura yaitu BG, DH, dan FH; 6 genotipe lain spesifik pada populasi Jawa daerah Ngawi yaitu AH, AF, BD, BE, EH, FG. Untuk memanfaatkan genotipe spesifik sebagai penciri genetika tanaman jati, perlu adanya kajian lebih lanjut tentang genotipe spesifik yang berkaitan dengan gen-gen penting yang mencirikan karakter jati. Hal itu dapat dilakukan dengan menambahkan jumlah sampel jati dan primer mikrosatelit serta kajian lebih lanjut tentang fenotipe dan kariotipe jati.

SIMPULAN

Keanekaragaman genetika jati penting dipelajari untuk mengetahui pola pewarisan sifat, kemampuan beradaptasi terhadap lingkungan dan untuk memelihara kelestarian hutan jati. Hal itu ditunjukkan dari analisis 3 lokus mikrosatelit pada 46 sampel jati ditemukan sebanyak 18 macam alel, nilai H_o , H_e dan PIC berturut-turut

0.5122; 0.6221; 0.5818. Nilai Ho menunjukkan tingkat keanekaragaman jati Jawa dan Madura tinggi. Nilai PIC menunjukkan bahwa lokus yang digunakan bersifat polimorfik. Keanekaragaman genetika juga dianalisis melalui hubungan kekerabatan yang menghasilkan dendrogram dengan koefisien kemiripan antara 0.3-1.00 yang membentuk dua kelompok. Ditemukan 12 genotipe spesifik yang dapat menjadi ciri khas apabila berkaitan dengan gen-gen penting sehingga berpotensi untuk analisis *fingerprinting*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., & Sorrels, M. E. (1993). Optimizing Parental Selection for Genetic Linkage Maps. *Genome*, 36, 181-186
- Badan Pusat Statistik [BPS] & Departemen Kehutanan [DepHut]. (2004). *Potensi Hutan Rakyat Indonesia 2003*. Jakarta: Pusat Inventarisasi dan Statistik Kehutanan kerjasama dengan Direktorat Statistik Pertanian
- Bennet, P. (2000). Microsatellites. *J. Clin. Phatol. Mol. Phatol*, 53, 177-183
- Boer, D. (2007). *Keragaman dan Struktur Genetik Populasi Jati Suawesi Tenggara Berdasarkan Marka Mikrosatelit*. Disertasi. Bogor: IPB.
- Cerenak, A., Jakse, J., Javornik, B. (2004). Identification and Differentiation of Hop Varieties Using Simple Sequence Repeat Markers. *J Am Soc Brew Chem*, 62(1), 1-7.
- Chasani, A. R. (2007). *Studi Keanekaragaman Genetika dan Hubungan Kekerabatan Provenan Jati (Tectona grandis linn.f.) Menggunakan Penanda DNA*. Tesis. Yogyakarta: Program Studi Bioteknologi Universitas Gajah Mada
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A Rapid Isolation Procedure from Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19, 11-15
- Febrianto, F., Syafii, W., & Barata, A. (2000). Kewetanan Alami Kayu Jati (*Tectona grandis* Linn. F) pada Berbagai Kelas Umur. *Jurnal Teknologi Hasil Hutan*, 8(2), 25-33
- Hartati, D., Anto, K., Taryono, Endang, S. & Widiatmoko, A. (2007). Pendugaan Keragaman Genetik di Dalam dan Antar Provenan Pulau (Alastonia Scholars (L.) R. Br.) Menggunakan Penanda RAPD. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 1 (2), 1-8.
- Jetse, J., Bandelj, D., & Javornik, B. (2002). Elavan New Microsatellites for hp (*Humulus lupulus* L.). *Mol Ecol Notes*, 2, 540-546.
- Kantety, R. V., Zeng, X., Bennetzen, J. L. & Zehr, B. E. (1995). Assessment of Genetic Diversity In Dent and Popcorn Inbred Lines Using Inter-simple Sequence Repeat Amplification. *Mol. Breed I*, 365-373.
- Lai, Y., Deepali, S., Norman, A. & Fengzhu, S. (2003). The Mutation Process of Microsatellites during the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Computational Biology*, 10(2), 143-155
- Lowe, A., Haris, S. & Ashton, P. (2004). *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Publishing. United Kingdom
- Maideliza, I. & Mansyurdin. (2007). Keragaman Alel Gadung Liar (*Dioscorea bulbifera* L) di Sumatra Barat. *Makara Sains*, 11(1), 23-27
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetika*. New York: Columbia University Press.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. Inc. New York.
- Palupi, E. R. (2005). *Genetika Biotic and Physiological Factor In Seed Production of Teak (Tectona grandis L.f): A Case Study In Clonal Seed or Chard In East Java*. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Pandey, R. N., Adams, R. P. & Flournoy, L. E. (1996). Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by Plant Polysaccharides. *Plant Molec Biol reporter*, 14, 15-22
- Pane, I. (1986). *Pemuliabiakan Ternak Sapi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama Porebski S, Bailey LG dan Baum BM. (1997). Modification of CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molec Biol reporter*, 15, 8-15
- Prana, T. K. & Hartati, N. S. (2003). Identifikasi Sidik Jari DNA Talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan Teknik RAPD: Skrining Primer dan Optimasi Kondisi PCR. *Jurnal Natur Indonesia*, 5(2), 107-112.
- Prasetyono, Joko & Tasliah. (2008). Marka Mikrosatelit: Marka Molekuler yang Menjanjikan. *Jurnal Tinjauan Ilmiah Riset Biologi dan Bioteknologi Pertanian*, 6(2)
- Qiagen. (2001). *Hotstar Taq PCR Handbook*. Germany: Qiagen.
- Rao, N.K. (2004). Plant Genetic Resource: Advancing Conservation and Use Through Biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, (2), 136-14
- Retnoningsih, A. (2009). *Molecular Basesd Classification and Phylogenetic Analysis of Indonesian Banana Cultivars*. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Santoso, T. J., Dwinita, W., Utami & Endang, M. S. (2006). Analisis Sidik Jari DNA Plasma Nutfah Kedelai Menggunakan Marka SSR. *Jurnal Agrobiogen*, 2(1), 1-7.
- Siregar, S. (2005). *Potensi Budidaya Jati*. Sumatra Utara: Fakultas Pertanian Universitas Sumatra Utara.
- Smagn, K., Bjornstad, A. & Ndjiindjop, M. N. (2006). An Overview of Molecular Marker Methods for Plants. *African Journal of Biotechnology*, 5, 2540-2568
- Wilkins, T. A. & Smart, L. B. (1996). Isolation of RNA from Plant Tissue. Di dalam: Krieg PA (ed). *A Laboratory Guide to RNA. Analysis and Synthesis*. New York: Wiley Liss